

PATENT APPLICATION
Customer Number 28289
Attorney's Docket No. 4369-031374

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of : **BACTERICIDAL, BACTERIOSTATIC
AND FUNGICIDAL COMPOSITION,
COMPRISING TWO OR MORE LIVE
SPECIES OF TRICHODERMA AND
ITS PREPARATION PROCEDURE, AND
A COMPOSITION BASED ON LATEX
FOR A PRUNING CICATRIZING THAT
INCLUDES A LATEX BASE AND.....**

Mario Reyes SALINAS
Juan Rencoret HOLLEY

Serial No. Not Yet Assigned

Filed Concurrently Herewith

Pittsburgh, Pennsylvania
July 24, 2003

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

MAIL STOP PATENT APPLICATION

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

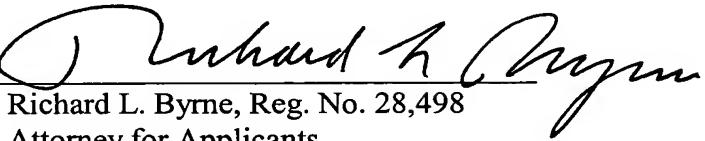
Attached hereto is a certified copy of Chilean Patent Application No. 1665-2002, which corresponds to the above-identified United States application and which was filed in the Chilean Patent Office on July 26, 2002.

The priority benefits provided by Section 119 of the Patent Act of 1952 are claimed for this application.

Respectfully submitted,

WEBB ZIESENHEIM LOGSDON
ORKIN & HANSON, P.C.

By


Richard L. Byrne, Reg. No. 28,498
Attorney for Applicants
700 Koppers Building
436 Seventh Avenue
Pittsburgh, PA 15219-1818
Telephone: 412/471-8815
Facsimile: 412/471-4094

Mario Reyes SALINAS et al.

ESTADO DE CHILE



MINISTERIO DE ECONOMIA, FOMENTO Y RECONSTRUCCION

DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

CERTIFICADO OFICIAL
El Jefe del Departamento de Propiedad Industrial y el Conservador de Patentes de Invención que suscriben, certifican que las copias (61) adjuntas corresponden a una solicitud de Patente de Invención presentada en Chile con fecha:

Nº 1665-2002
26 DE JULIO DE 2002

Rogelio Campusano Saez
Conservador de Patentes de Invención

Jefe Departamento de Propiedad Industrial

Santiago, 10 de Julio de 2003.

22 FECHA DE SOLICITUD			 REPUBLICA DE CHILE MINISTERIO DE ECONOMIA FOMENTO Y RECONSTRUCCION SUBSECRETARIA DE ECONOMIA DEPTO. PROPIEDAD INDUSTRIAL		11 NUMERO DE PRIVILEGIO
DIA MES AÑO					21 NUMERO DE SOLICITUD
41					
DIA MES AÑO					
12 TIPO DE SOLICITUD			PRIORIDAD: TIPO:	ESTADO:	DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS
<input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> PATENTE DE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL <input type="checkbox"/> TRANSFERENCIA <input type="checkbox"/> CAMBIO DE NOMBRE <input type="checkbox"/> LICENCIA			<input type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL	<input type="checkbox"/> CONCEDIDA <input type="checkbox"/> EN TRAMITE	<input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> MEMORIA DESCRIPTIVA <input type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES <input type="checkbox"/> DIBUJOS <input checked="" type="checkbox"/> PODER <input type="checkbox"/> CESION <input type="checkbox"/> COPIA PRIORIDAD <input type="checkbox"/> PROTOTIPO
			31 N°:		<input type="checkbox"/> CERTIFICADA
			33 PAIS:		<input type="checkbox"/> TRADUCIDA AL ESPANOL
			32 FECHA:		
TITULO O MATERIA DE LA SOLICITUD					
Composición bactericida, bacteriostática y funguicida que comprende dos o más especies vivas de Trichoderma y su procedimiento de preparación, y una composición a base de látex para pintura cicatrizante de poda que comprende una base de látex y la composición de dos o más especies vivas de Trichodermas.					
71 SOLICITANTE(S): (APELIDO PATERNO, APELLIDO MATERO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, PAIS, TELEFONO)					
MARIO REYES SALINAS y JUAN RENCORET HOLLEY Monseñor Muller 10, Departamento B, Providencia, Santiago, Chile					
72 INVENTOR O CREADOR : (APELIDO PATERNO, APELLIDO MATERO, NOMBRES - NACIONALIDAD)					
MARIO REYES SALINAS y JUAN RENCORET HOLLEY Monseñor Muller 10, Departamento B, Providencia, Santiago, Chile					
74 REPRESENTANTE:(APELIDO PATERNO, APELLIDO MATERO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, TELEFONO)					
CAREY Y CIA. LTDA., Guillermo Carey Claro Miraflores 222, piso 24 , Santiago, rut.: 87.010.500-2					
<small>DECLARO/ DECLARAMOS QUE LOS DATOS QUE APARECEN EN LOS RECUADROS DE TONO ROSADO SON VERDADEROS Y TAMBIEN CONOCER EL ART 44 DE LA LEY N° 19.039 SOBRE PROPIEDAD INDUSTRIAL Y QUE EL PRESENTE DOCUMENTO CONSTITUYE UNA SOLICITUD FORMAL.</small>					
<i>Guillermo Carey Claro.</i> <i>6919481-5</i>					
FIRMA Y R.U.T. REPRESENTANTE			FIRMA Y R.U.T. SOLICITANTE		
			RECEPCION		

INSTRUCCIONES:
 1.- LLENE SOLAMENTE LOS RECUADROS DE TONO ROSADO CON CARACTERES NEGROS DE MAQUINA(ANO MANUSCRITO)
 2.- SE ENTIENDE POR PRIORIDAD AQUELLA PROTECCION SOLICITADA O CONCEDIDA ANTERIORMENTE POR EL MISMO INVENTO, GENERALMENTE EN EL EXTRANJERO

ORIGINAL

• 26 JUL 2003 •
 CHILE

0044312



(19) REPUBLICA DE CHILE
MINISTERIO DE ECONOMIA
FOMENTO Y RECONSTRUCCION
SUBSECRETARIA DE ECONOMIA



DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

(11) N° REGISTRO

(12) TIPO DE SOLICITUD:

- | | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> INVENTION | <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD |
| <input type="checkbox"/> PRECAUCIONAL | <input type="checkbox"/> MEJORA |
| <input type="checkbox"/> REVALIDA | |

(43) Fecha de Publicación:

(51) Int. Cl. °:

(21) Número de Solicitud:

(2) fecha de Solicitud

(30) Número de Prioridad: (país, n° y fecha)

(71) Nombre Solicitante: (incluir dirección y tel.)

MARIO REYES SALINAS y
JUAN RENCORET HOLLEY
Monseñor Muller 10, Departamento
B, Providencia, Santiago, Chile

(72) Nombre Inventor(es): (incluir dirección)

MARIO REYES SALINAS y JUAN
RENCORET HOLLEY
Monseñor Muller 10, Departamento B,
Providencia, Santiago, Chile

(74) Representante: (incluir dirección y teléfono)

CAREY Y CIA. LTDA.,
Guillermo Carey Claro, Miraflores 222, piso 24
Santiago, Rut.: 87.010.500-2
Fono: 3657284

(54) Título de la Invención: (máximo 330 caracteres)

Composición bactericida, bacteriostática y funguicida que comprende dos o más especies vivas de Trichoderma y su procedimiento de preparación, y una composición a base de látex para pintura cicatrizante de poda que comprende una base de látex y la composición de dos o más especies vivas de Trichodermas.

(57) Resumen: (máximo 1600 caracteres)

La presente invención describe una composición bactericida, bacteriostática y funguicida que comprende dos o más especies vivas de Trichoderma y su procedimiento de preparación. Además se describe una composición a base de látex para pintura cicatrizante de poda que comprende una base de látex y una composición que comprende dos o más especies vivas de Trichodermas.

26 JUL 2002

033259

P O D E R



En Santiago a 22 de mayo de 2002 los Poderdantes, don Juan Rencoret Holley Cédula Nacional de Identidad N° 4.770.557-2 y don Mario Reyes Salinas, Cédula Nacional de Identidad N° 9.087.546-9 ambos domiciliados en calle Monseñor Muller 10, Departamento B Comuna de Providencia de la ciudad de Santiago declaran por el presente otorgar a los señores Carey y Compañía Limitada, sociedad de responsabilidad limitada constituida bajo las leyes de la República de Chile, domiciliados en calle Miraflores 222, piso 24, comuna de Santiago, Santiago de Chile, y a los abogados del estudio Carey y Cia. Limitada Sres. Jorge Carey Tagle, Rafael Vergara Gutiérrez, Diego Peralta Valenzuela y Guillermo Carey Claro, del mismo domicilio anterior un poder especial tan amplio y bastante cual por derecho sea necesario para que, conjunta o separadamente, recaben ante las oficinas y autoridades que correspondan en la República de Chile el registro de toda clase de signos distintivos, marcas comerciales denominativas, mixtas o etiquetas, patentes de invención sean estas de productos o procedimientos, patentes de semillas y plantas, modelos de utilidad, diseños industriales, invenciones de servicio, derechos de autor, registros y autorizaciones sanitarias, farmacéuticas, aduaneras, y nombres de dominio y cualquier otro privilegio industrial (en lo sucesivo "Los Derechos"), a cuyo efecto los faculta para realizar ante dichas autoridades todas las gestiones necesarias al cumplimiento del objeto indicado, sin que la enunciación siguiente sea restrictiva o limitativa sino meramente enunciativa: a) presentar solicitudes de registro, cesión, transferencia y/o anotación de cambio de nombre, de contratos de licencia y otras, formular descripciones, efectuar declaraciones, y enmendar dichas solicitudes, descripciones y declaraciones; b) deducir reclamaciones, reconsideraciones, apelaciones, quejas y todos los demás recursos que la ley franquea; c) abonar todos los impuestos, cuotas, gastos y cualesquier otros pagos determinados por la Ley; d) oponerse y protestar contra cualesquiera solicitudes que, a juicio de el o los apoderados, pudieran prestarse a confusión o infringir o de cualquier otro modo perjudicar Los Derechos o intereses de los Poderdantes, con facultad, asimismo, a su discreción, para renunciar a gestiones judiciales, entendiéndose que este poder los faculta para representar a los poderdantes en juicio, para iniciar, proseguir y contestar querellas criminales y/o juicios civiles desistirse, transar, comprometer, interponer toda clase de recursos y desistirse de ellos y percibir; e) comprar, adquirir, aceptar y transferir a cualquier título Los Derechos, y transferir los de propiedad de los Poderdantes a terceros, estipular precios, plazos y demás condiciones; f) convenir contratos de licencia de privilegios industriales sobre Los Derechos como licenciante o licenciatario, pudiendo establecer derechos para elaborar, disponer la



elaboración, usar, preparar, envasar, distribuir y vender o disponer la distribución o venta a través de un tercero, y solicitar la anotación y/o registro de dichos contratos, estipular precios, derechos, plazos y demás condiciones; g) convenir acuerdos de limitación y/o especificación de derechos de propiedad industrial y/o intelectual; h) recibir y retirar documentos y valores de todo tipo a nombre de los poderdantes; i) justificar explotaciones, hacer modificaciones en todos los documentos presentados; solicitar testimonios, desistirse de procedimientos; cobrar y percibir.

Finalmente, los faculta para practicar todos los actos, gestiones y diligencias necesarios a los fines expresados, pudiendo asimismo delegar este poder en todo o en parte y revocar delegaciones, con la obligación de tener por firme y válido todo cuanto se hiciere y practicara en virtud de este poder.



Mario Reyes Salinas
RUT: 9087546-9

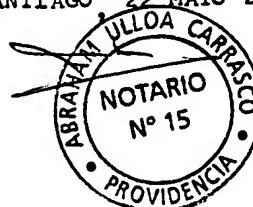


Juan Rencores Holley
RUT: 4770755-2

Notario Público

Fecha

FIRMARON ANTE MI DON JUAN MANUEL RENCORET HOLLEY,
C.I.4.770.755-2 NACIONAL Y DON MARIO CELEDONIO REYES SALINAS,
C.I.9.087.546-9 NACIONAL. SANTIAGO 22 MAYO 2002.



MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención describe una composición bactericida, bacteriostático y funguicida en polvo en base a la coexistencia, cohabitación y repulsión mutua de dos o más especies vivas de Trichoderma y su procedimiento de preparación.

La composición de la presente invención permite un control funguicida y bacterial sobre la mayoría de los fitopatógenos de importancia agrícola a nivel foliar, radicular, vascular y/o en frutos. Además es un producto soluble en cualquier tipo de agua, utilizándose para un tratamiento curativo y/o preventivo tanto en semilla, plantas, árboles ornamentales y/o frutales, frutos y/o tierra.

Las especies de Trichoderma fueron descubiertas a fines de los años 1940 y desde ese momento se ha estado explorando su potencial como hongo antagonista de hongos fitopatógenos. Actualmente se conocen más de 400 especies de Trichoderma, las cuales son de fácil aislamiento, pero de difícil cultivo.

La actividad antagonista por espacio y nutrientes frente a hongos fitopatógenos e inclusive frente a especies de Trichoderma, razón por la cual no existen mezclas de dos o más especies de Trichodermas vivos, esta ampliamente documentada tanto en Europa como en centros de investigación Americanos.

El desarrollo de Trichoderma hasta ahora está frenado debido a la imposibilidad de encontrar una técnica que permita su cultivo masivo y debido a que solo puede existir una especie de Trichoderma por cultivo.

La forma actual de obtener una especie de Trichoderma a la forma de esporas, se realiza mediante el cultivo fermentativo en bioreactores, para posteriormente liofilizar y filtrar la materia obtenida por un tamiz que deje pasar solo las esporas. La otra forma es inocular harinilla de trigo con una especie de Trichoderma y luego diluirlo usando tierra de diatomeas y/o una matriz arcillosa. Estos dos métodos son de baja productividad y no permiten por las características antagónicas de las especies de Trichodermas, la producción de dos o más

26 JUL 2002
ESTADO UNIDO DE AMERICA
U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

especies juntas y por lo tanto no existe posibilidad de obtener enzimas líticas, ya que estas solo se producen en presencia de otro hongo.

Las especies de Trichodermas ejercen una actividad antagónica violenta frente a otros hongos incluyendo de su misma especie mediante el siguiente mecanismo:

- A. Liberación de enzimas volátiles que desnaturalizan y digieren la estructura del hongo con el cual compiten.
- B. Rápido anclaje en el sustrato lo que permite que las estructuras reproductivas del hongo (esporas) con el cual compiten no logren ser viables.
- C. Establecimiento de una simbiosis con una planta o estructura vegetal viva a la cual microparasitan y liberan sustancias beneficiosas para el hospedador, generalmente micro trazas de ácido giberelico y/o estreptomicina en el caso de existir en el hospedador una ataque bacteriano leve.

Los preparados madres que existentes actualmente en el mercado internacional como nacional son obtenidos por crecimiento vegetativo de una especie de Trichoderma sobre fase sólida y/o agar papa dextrosa. Posterior a esto se realiza una inoculación en germen de trigo, paja, harinilla, tierra de diatomeas y/o matriz arcillosa. El producto formulado solo contiene esporas inactivas de una especie de Trichoderma en un excipiente inerte generalmente tierra de diatomeas.

Debido a las características de su obtención debe mantenerse en una línea de frío hasta su uso, de otra forma se desnaturaliza, pudiendo entrar en fase de descomposición rápidamente.

El producto obtenido por esta vía solo puede ser usado en fase preventiva, ya que los propágulos de una especie de Trichoderma deben desarrollarse para comenzar a realizar su acción antagónica sobre patógenos, el que generalmente es uno, a controlar.

El producto formulado al estar constituido por una especie de Trichoderma tiene un espectro de acción muy reducido sobre complejos de hongos

fitopatógenos. Y además si la población de fitopatógenos presentes es muy alta, el producto no es capaz de controlarlos pues la agresividad del fitopatógeno impide el desarrollo de las esporas de Trichoderma, el cual es el principio activo del producto.

La actividad de la especie de Trichoderma contenido en la formulación del producto como principio activo, al ser aplicado en el campo se ve restringida tanto en su fase metabólica como crecimiento vegetativo por factores ambientales, tales como el pH de agua, la tierra, la actividad de fungicidas químicos, el vientos que lo deshidratan, etc., como también por la ubicación de los fitopatógenos a controlar teniendo nula acción sobre patógenos radiculares y medulares y acción errática, principalmente por las condiciones ambientales, sobre fitopatógenos de fruto y follaje.

El producto formulado de esta forma tiene cero acción sobre patologías vasculares, pudiendo ser medianamente efectivo solo si se perfora los troncos para inocular el preparado a la forma de bala y/o inyección.

En los últimos años han surgido intentos por facilitar y masificar su uso, existiendo en el mercado mundial preparados que contienen una especie de Trichoderma en forma de balas, para enfermedades de tipo vascular, que deben ser aplicadas post perforación del tronco del árbol, con el consiguiente estrés para el vegetal, junto con diseminar la enfermedad al retirar la broca con la que se realizó la perforación del tronco y que actúa como sonda al ir inoculando territorios sanos durante el proceso de penetración y posterior retiro de esta.

El uso de esta formulación está restringido a especies arbóreas y/o leñosas, y el método no es aplicable a cultivos menores como lo son los hortofrutícolas como por ejemplo la remolacha, lechuga, frutillas, etc.

También existen composiciones que comprenden una de una especie de propágulos de Trichodermas en solución acuosa, la cual se deteriora rápidamente dentro de un plazo de horas, aun en envases sellados, debido a la rápida



proliferación de bacterias, otorgándole un olor penetrante y característico de la pudrición. El mismo olor esta presente en preparaciones sólidas cuya cadena de frió fue rota.

Las composiciones de Trichoderma disponibles en el mercado comprenden una especie de Trichoderma, generalmente el Harziano en la forma de propágulos (esporas), no existiendo mezclas de dos o más especies de Trichoderma cohabitando juntos en un medio de naturaleza bactericida y bacteriostático, debido a su naturaleza antagónica ya descrita.

En el estado de la técnica no existen antecedentes que demuestren su uso potencial en medicina humana como veterinaria para el control de bacterias y/o hongos oportunistas.

En el documento AU 8479301 se describe un la producción y el uso de enzimas inducidas desde Trichodermas y bacterias para el control de pestes de plantas y para procesos industriales. En este documento a diferencia de la presente invención se utilizan bacterias para controlar bacterias.

En el documento NZ 335107 describe Trichoderma celulasa aislada desde un cultivo de Trichoderma longibrachiatum con un peso molecular estimado de 95-105 kD. En este documento a diferencia de la presente invención se obtienen Trichoderma longibratum y otras especies por vía fermentativa y las isoenzimas se encuentran contenidas en el caldo de cultivo y deben ser purificadas, a cada especie le corresponde un fermentador individual ya que no cohabitan juntas.

En el documento US 2028500 se describe un proceso para la preparación de nuevos medios de cultivo para plantas para su multiplicación de bio-control fúngico. En este documento a diferencia de la presente invención solo podrían llegar a vivir juntas dos o mas variantes de una misma cepa en restos fermentativos.

En el documento CA 2304107 se describe un proceso para proveer impregnabilidad a la madera por medio de un pretratamiento con fúngicos. En este

documento a diferencia de la presente invención se identifica un método para proteger árboles transgénicos del ataque de hongos, no de insectos y bacterias.

En el documento WO 0183706 se describe un pesticida microbiológico activo contra patógenos fúngicos de plantas y su procedimiento de preparación. En este documento a diferencia de la presente invención el producto es en base de esporas, micelio, o mezcla con características de fungicida usando solo *Trichoderma harzianum* YC459 (accesión 0772BP).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En la presente invención se describen composiciones que comprenden una combinación de dos o más especies de Trichodermas naturales o modificadas genéticamente, por métodos radiactivos u otra forma, cepas madre de especies y/o sub especies de Trichodermas de cualquier origen natural o de laboratorio, vivas y activas en cualquiera de sus fases de crecimiento vegetativo, esporas micelio, fraccionado o en distintas proporciones.

Más específicamente en la presente invención se describen composiciones que comprenden una combinación de tres especies de trichodermas naturales o modificadas genéticamente, por métodos radiactivos u otra forma, cepas madre de especies y/o sub especies de Trichodermas de cualquier origen natural o de laboratorio, vivas y activas en cualquiera de sus fases de crecimiento vegetativo, esporas micelio, fraccionado o en distintas proporciones.

En la presente invención se identifican y seleccionan las cepas de *Trichoderma* que presentan por separado un poder antagonístico frente a un número determinado de hongos fitopatógenos de interés económico. La identificación de las cepas madres se realizó de acuerdo a los criterios que definen a cada especie contenidos en: "Moulds, their isolation, cultivation and identification", 1981, Dr. David Malloch, University of Toronto". De acuerdo a este



criterio las cepas seleccionadas fueron: *Trichoderma viride*, *Trichoderma Longibratum* y *Trichoderma Harziano*.

Posteriormente se procedió a cultivarlas en un bioreactor tradicional alimentado con glucosa - maltosa con fines de obtener una solución acuosa rica en secreciones pero pobre en biomasa de Trichodermas. Análisis químicos permitieron determinar la presencia de iso enzimas líticas que corresponden a : Carboxymetilcelulasa, quitanasa, beta 1, 3 gluconasa, beta xylosidasa, xylanasa y 6pentilalfa pirona. Establecida la presencia de las sustancias anteriormente descritas, se realizó un tamizado que permitió recoger las esporas presentes en este cultivo.

Las esporas de estos hongos fueron cultivadas en una serie de preparaciones de acuerdo a las indicaciones contenidas en el : "Moulds, their isolation,cultivation and identification", 1981 , Dr. David Malloch, University of Toronto, hasta llegar a aislar en frascos separados cada especie.

Se establece la necesidad de mantener dos o más especies vivas y cohabitando juntas, con el fin último de sinergizar su espectro de acción frente a fitopatógenos, como también la necesidad de contar con altas concentraciones de las isoenzimas líticas ya descritas que le otorgarían un poder curativo al producto final, se comenzó por seleccionar un medio de cultivo sólido que permitiera el crecimiento armónico y rápido de dos o más especies y que fuera capaz de absorber las secreciones liberadas por estas especies cuando se agredieran mutuamente y posteriormente cederlo en solución acuosa. El medio seleccionado fue la avena, que para evitar la contaminación, previamente se esteriliza y luego se incorpora en el cultivo.

Para evitar la aniquilación de las especies al estar cohabitando juntas en el cultivo, se realizó una transformación mediante la exposición a radiación de la cepa de *Trichoderma Longibratum*, transformándola por selección inducida en una cepa resistente a las secreciones fungicidas que liberan las dos especies de

Trichodermas que contiene el producto final. Más específicamente, las especies madres de Trichoderma Longibratum fueron sometidas a micro exposiciones de cobalto durante 50 generaciones, obteniéndose una cepa de características únicas.

El micro nutriente se selecciona después de haber ensayado con los distintos medios y combinaciones posibles de estos . La avena resultó ser el medio donde las dos o más especies de Trichodermas se desarrollaron de manera mas eficiente, además que era capaz de contener y posteriormente ceder en solución acuosa las isoenzimas líticas.

La realización del cultivo definitivo se hace sobre una capa de avena levemente hidratada, la cual fue inoculada con una mezcla de dos o más especies. La avena micronizada, es sometida a esterilización por exposición controlada de microondas para evitar la degradación de fructuosa contenida en su germen.

La avena micronizada como micro nutriente cumple las siguientes funciones:

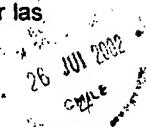
Soporte físico: permite al hongo crecer en su superficie, pudiendo establecer a simple vista la presencia de algún otro patógeno no deseado o cambios mutágenos de estas especies no deseados.

Soporte nutricional: Entrega a los hongos todos los requerimientos nutricionales para su desarrollo.

Aislante térmico: Durante el proceso de crecimiento de los hongo se realizan una serie de reacciones exotérmicas producto del catabolismo de estos y de reacciones que ocurren entre las distintas enzimas que liberan y el ataque de estas a los azúcares contenidos en la avena.

Solución Tampón: El producto final en solución acuosa, actúa como una solución tampón, para aguas alcalinas.

Esponja: Durante la etapa de cultivo de las dos o más especies de Trichoderma, que dan origen al producto final, la avena es capaz de absorber las



secreciones líticas que liberan los Trichoderma durante el proceso de antagonismo. Estas secreciones ahora contenidas en la avena, son de naturaleza hidrosolubles, por lo cual en solución acuosa se integran a ella, abandonado la matriz de avena casi en su totalidad.

Regulador del intercambio nitrógeno en la estructura vegetal a proteger.

Absorbente y transportador de las isoenzimas solubles en agua, que liberan las dos o más especies de Trichodermas al agredirse mientras cohabitán el mismo espacio.

Además al sustrato se incorpora extracto de Rubus, lo cual permite por un lado dar a la composición una condición de bactericida bacteriostático, como también permite al cultivo estar libre de contaminación por bacterias oportunistas. La adición de extracto hidroalcohólico de Rubus sp al micro nutriente, se realiza en una concentración no inferior a 0,68 mg/ml.

Para aumentar aún más su espectro de acción se selecciona al extracto hidroalcohólico de Rubus sp, cuyos componentes han demostrado una importante acción bactericida bacteriostática. El producto generado resulta de un poder fungicida bactericida bacteriostático por las secreciones aportadas y la actividad desarrollada por las especies de Trichodermas contenidas. La acción entomocida resulta de la invasión al sistema digestivo, respiratorio de larvas, ninfas, adultos y/o al infestar al huevo de distintas especies, también se ha reportado que la acción entomocida se ve potenciada por el extracto hidroalcohólico de Rubus, que tiene características bactericidas bacteriostáticas, y por lo tanto también teratogénicas para los insectos que son expuestos a ellas, no siendo viable los huevos en contacto con estas sustancias y/o la ovipositora realizadas por hembras que tuvieron contacto con el producto en sí.

Además se pueden utilizar otros extractos vegetales, tales como: *Oenothera rosea* Aut., *Alaysia triphylla* (L.) Herit., *Arenaria lycopodioides* Wiild. Ex Schdl. Y *Erodium cicutarium* (L.) L. Herit, *Birsonima cassifolia*, *Citrus limonia*.

La especie de Trichoderma, corresponde a hongos de tipo filamentoso, que son antagónico con otros hongos, incluyendo a los de su misma especie, como: harzianum, viride, polysporum, longibratum, koningii, principalmente y variaciones de estas obtenidas en laboratorio identificadas como T22, Tr 115, Tr 116, KRL-AG2 (Rifai), incluyendo holoformas como Hypocrea, Podostroma, la mayoría de las subespecies seleccionadas de acuerdo al grado de agresividad y capacidad de supervivencia en condiciones de campo. Sin embargo lo que se desea proteger no es la combinación de 2 o más especies de Trichoderma, pues esta existe en la naturaleza, y en preparaciones de tipo comercial, sino que se desea proteger la combinación de 2 o más especies vivas de Trichodermas en cualquier fase de crecimiento vegetativo, capaces de liberar enzimas líticas de repulsión, crecer juntas en un medio de cultivo y ser inmunes a las condiciones ambientales de tal forma que puedan ejercer su acción controladora por un plazo no inferior a un día.

Las especies que conforman la composición corresponden a subespecies seleccionadas por su alta adaptabilidad a las condiciones fluctuantes del medio ambiente, lo que les permite mantenerse vivas.

Más específicamente las tres especies de Trichodermas seleccionadas corresponden a Trichoderma Harziano, Trichoderma Viride y Trichoderma Longibratum.

Las composiciones que comprenden las de tres especies de Trichodermas vivas se encuentran en las siguientes proporciones: 10:20:70 o 99:05:05.

La composición corresponde al extracto hidroalcohólico de Rubus sp. y las secreciones específicas contenidas en el micro nutriente post crecimiento vegetativo y metabólico de las especies de Trichoderma junto al Trichoderma vivo resistente a factores ambientales, las secreciones son capturadas por el método descrito y posteriormente cedidas en solución acuosa.

La composición contiene a) enzimas líticas Carboxymetilcelulasa, Quitinasa, b1,3 gluconasa, b xylosidasa , xylanasa, b) alta concentración de 6 pentil alfa

26 JUL 2002
Santos

pirona (lactona volátil que desprende un penetrante aroma a coco, dependiendo de la concentración de esta, que le da la característica a nuestro producto), c) Estreptomicina y auxinas en micro trazas, (los metabolitos descritos en a y b son responsables a nivel celular de vacuolación, granulación, lisis y desintegración de la célula expuesta a estas secreciones), d) una concentración no inferior a 0,68 mg/ml de principios activos adicionados en el extracto hidroalcohólico de Rubus sp., que le otorgan el carácter de bactericida y bacteriostático

La acción Bactericida y bacteriostática de muy bajo espectro, esta descrita en varios trabajos (France,et al,2001; Stefanova M,1995 Fernández, 2001) y se debe a la liberación bajo presencia de bacterias de estreptomicina, ejerciendo una acción sobre bacterias sensibles a la estreptomicina, los cuales representan un espectro muy pequeño, razón por la cual se le adiciona al cultivo el extracto de Rubus, que presenta un espectro de acción sobre bacterias muy alto, sin ninguna acción sobre hongos, con lo que se permite un crecimiento sin problemas del Trichoderma.

El *Trichoderma longibratum*, previamente tratado con radioterapia, resultó inmune a las secreciones que liberan las especies harziano y viride.

Estas secreciones se inactivan por la presencia de metabolitos que libera el *longibratum* que cambian el pH del medio permitiendo la absorción de estas por parte de la avena. Estas enzimas son de tipo termolábiles y en la avena se inactivan sin degradarse. Cuando el cultivo a llegado a máximo crecimiento, las bandejas contenedoras de los hongos son cosechadas e inmediatamente diluidas en sustrato que permite una crecimiento mas lento del hongo y una dilución de las enzimas que pudieran llegar a afectar las estructuras de los hongos durante el periodo de envejecimiento del producto.

Al estar en condiciones distintas a las del cultivo, como por ejemplo como producto ya envasado, la tasa de crecimiento decrece dramáticamente.

Las especies que conforman la composición corresponden a subespecies seleccionadas por su alta adaptabilidad a las condiciones fluctuantes del medio ambiente, lo que les permite mantenerse vivas. Esta adaptabilidad le permite ejercer su acción antagonista frente a los hongos fitopatógenos durante el lapso de 20 días. Las secreciones contenidas en el micronutriente, contenidas en una concentración biológicamente activas, son de dos tipos:

Funguicidas: Aportadas por Trichodermas y representadas principalmente por 6 pentilalfa pirona, carboxymetilcelulasa, quitinasa, beta 1,3 gluconasa, beta xylosidasa y 1,4beta xylanasa, que destruyen la estructura del hongo patógeno.

Bactericida Bacteriostático: aportadas por el extracto hidroalcohólico de Rubus representada principalmente por los constituyentes químicos pueden ser observados según Costa (1994), ácidos libres, sustancias pépticas, ácidos ascórbico, fólico, acético, caproico y benzoico, así como, cumarinas. A esto debe sumarse la estreptomicina que liberan los Trichodermas en presencia de bacterias.

Las secreciones contenidas, el micro nutriente y la biomasa de Trichodermas activas y vivas, debido a su amplio espectro funguicida bactericida bacteriostático y entomocida ejercen acciones:

Curativa: al mezclar el producto en agua, el micro nutriente libera todas las secreciones contenidas en él, las que son solubles en agua, también los Trichodermas vivos y activo en todas sus fases de crecimiento. Estas secreciones son funguicidas de mayor potencia que los derivados de las familias de fungicidas químicos. También el aporte de sustancias contenidas en el extracto hidroalcohólico de Rubus sp. otorgan las características de bactericida bacteriostático al producto formulado.

La estructura madre de las lactonas ($R=C_2H_5$ y $R=CH_3$) presenta dos sitios activos de unidad biológica lo que permite una acción de contacto, pero también una acción translaminar, pudiendo llegar el centro de la hoja manteniendo un

26 JUL 2002
CAR

medio no propicio para la proliferación de patógenos. Esta estructura en los insectos también provoca la liberación del ácido gamma aminobutírico, induciéndose una migración masiva de iones cloruros al interior de la células de los insectos induciendo una parálisis que provoca su muerte. Las otras secreciones líticas ya descritas afectan la estructuras de hifas y unidades reproductivas de los hongos, manteniendo una actividad sostenida por espacio de 15 días antes de comenzar a degradarse.

Los fungicidas tradicionales tienen en sus moléculas un sitio activo de actividad biológica, por lo que es más fácil que los hongos adquieran una resistencia y las plagas muten, obteniendo así resistencia / tolerancia debido a que la plaga está expuesta a una variable .

Se realizaron pruebas de campo en distintas plantas afectadas con rhizostomia, fusarium, plateado, esclerotinia, botrytis, cáncer bacterial, infección por pseudomonas, todas ellas en un grado de avance cuya única indicación era arrancar las plantas. Se realizó tratamiento en dosis de 2 kilos de la composición de la presente invención por hectárea con dilución en hasta 600 litros de agua, fue aplicada con bombas espalderas y/o maquinaria, dependiendo de la extensión afectada como también del tipo de vegetal. La evaluación se realizó a los 2 días visualizándose una inhibición del crecimiento del patógeno(s) que estaba(n) presente en la(s) planta(s). Se mantuvo un control de la experiencia por espacio de 26 días, determinándose que al día 21 la acción de la composición comenzada a decaer, manifestándose un crecimiento de los patógenos y/o nueva reinfección, obteniéndose al día 26 un control inferior al 60% de la población de fitopatógenos. Este margen de control permitió para fines comerciales establecer una dosis d acción curativa de 2 kilos de la composición formulada con dilución en cualquier tipo de agua de hasta 600 litros, brindando un efecto residual de 20 días.

Curativa y preventiva: En cultivos que históricamente habían tenido perdidas por ataques fungobacterianos, a pesar de uso de fungicidas químicos, se aplicó

la composición de la presente invención en dosis de 1 kilo por hectárea con mojamiento de hasta 600 litros de agua. En semillas se estableció que el porcentaje histórico de caída de plantas por ataques de complejos de hongos (dumping off) se redujo de 40% a 5% con el uso de la composición. En cultivos mayores (frutales) y menores (hortalizas), se establece que aplicando la composición de la presente invención dos o tres días antes de una lluvia y/o inmediatamente posterior a ella se reduce el porcentaje de ataque de hongos oportunistas (oidio, botrytis, mildiu, esclerotinia, cladosporum) de un 90% a 3% con el uso de la composición, manteniendo el control por espacio de 20 días (efecto residual).

La acción curativa y preventiva de la composición de la presente invención es frente a fitopatógenos únicos o asociados a complejos de hongos y/o asociaciones hongo bacterias, tales como botrytis, oidio, plateado, enrollamiento clorótico, rhizostonia, raíz corchosa, cáncer bacterial, cladosporum, fusarium, pudrición ácida, armilaria, tapiar cerasi, monilinia, verticillium, roya, agrobacterium tumefaciens, citosporiosis, wilsonomyce carpophilus, phytophthora, elsinoe veneta, septoria rubi, fumagina, didymella sp, erwinia sp, alternaria sp, sclerotinia, mildiu, macrophomina sp, bacterios aeróbicos y anaeróbicos sensibles a la estreptomicina, en general macrólidos, ciclosporinas en particular y/o al extracto de Rubus sp.

La acción preventiva de la composición de la presente invención se obtiene al desnaturalizarse las enzimas fungicidas, las especies de Trichodermas ya han colonizado el área y comienzan su acción antagónica frente a poblaciones de hongos que pudieron quedar como también evitando la nueva re infestación de estos por espora que pudieran llegar por factores ambientales y/o por labores de labranza.

La acción insecticida o entomocida de la composición de la presente invención esta descrita para las especies de lepidoptera como rhyacionia buoliana, y otros

insectos patógenos como por ejemplo margaroe sp, de ciclo larval completo o incompleto sensibles a las exotoxinas liberadas por la composición. Estas infectan el huevo haciéndolo no viable, pudiendo incluirse llegar a infectar al individuo cuando se alimenta de vegetales contaminados con estas micotoxinas.

La composición de la presente invención que comprende dos o más especies de Trichoderma activos y vivos en distintas etapas de crecimiento vegetativo junto a las secreciones contenidas en el nutriente previamente hidratado con una concentración de extracto hidroalcohólico de Rubus sp., que pasa a llamarse excipiente biológico activo permite un:

Control de fitopatógenos medulares y/o vasculares, bacteriales aislados o en complejos, hongos aislados o en complejos y/o complejo de hongos bacterias, solo por aplicaciones foliares y riego por goteo, sin necesidad de realizar perforaciones para introducir producto.

Control secundario sobre nematodos al aumentar la masa radicular de las plantas y al bajar también medio grado de temperatura de gestación de los nematodos.

Control de fitopatógenos aéreos por aplicaciones foliares, bacteriales aislados o en complejos, hongos aislados o en complejos y/o complejos de hongos bacterias. Se realizaron aplicaciones para determinar dosis, espectro de acción y residualidad del producto formulado. La presencia de estreptomicina y de los principios activos contenidos en Rubus sp, resultaron a nivel de laboratorio los responsables del control bactericida y bacteriostático . A medida que avanza el daño en una planta y o fruto producto de la infectación primaria de un hongo, normalmente es campo fértil para que lleguen a cohabitar otros organismos oportunistas, incluidos insectos. Las pruebas realizadas en campo con una dosis de 1 a 2 kilos (según gravedad del ataque, siempre con dilución máxima de 600 litros agua) de la composición de la presente invención por hectárea aplicada con

bomba espaldera y/o maquinaria directamente a follaje y fruto, permitió verificar la acción erradicadora de la composición, la cual se mantuvo por espacio de 20 días.

Control de fitopatogenos radiculares en aplicaciones de riego por goteo, bacteriales aislados o en complejos, hongos aislados o en complejos y/o complejo de hongos bacterias.

Control de fitopatógenos radiculares bacteriales, hongos y/o complejos de hongos bacterias: Lo mismo que para el control de fitopatogenos medulares y/o vasculares, pero en este caso la aplicación se realizó vía riego cintas o riego tecnificado.

Control de fitopatógenos medulares y/o vasculares, bacteriales, hongos y/o complejos de hongos bacterias: Igual que para el control de fitopatogenos medulares y/o vasculares, aquí la aplicación es 2 kilos por hectárea, con mojamiento a follaje y tronco.

Control secundario sobre nematodos: Esta ampliamente documentado que los Trichodermas liberan en forma sostenida ácido gibrelíco, este es un promotor importante de mitosis y meiosis, por lo cual en las plantas se obtiene una mayor masa radicular, que para una población constante de nematodo se traduce en un control secundario de este, por otro lado el micronutriente, contenido en la dilución acuosa, logra bajar en medio grado la temperatura, por lo un porcentaje de huevos de nematodos no son viables.

La composición de la presente invención puede aplicarse a plantas, árboles y/o frutos en forma de polvo seco, mediante técnica de voleo, en impregnación de semillas, por medio de solución acuosa, directamente a las plantas, incorporado a tanques de ferti-riego, por medio de maquinas espalderas, maquinas pulverizadoras y maquinaria electrostática. Dependiendo de la severidad del ataque la dosis son 1 kilo hectárea o 2 kilo hectárea, por cada 600 litros de agua.

Además se describe un método para proteger plantas, suelos, semillas, árboles y/o frutos contra el daño de una peste de insectos, bacterias, hongos, virus y/o

combinación de dos o más de estos agentes, que comprende plantar una planta o árboles transgenicos que expresan una sustancia específica de naturaleza entomocida, fungicida, bactericida, bacteriostático, nematicida y/o otras enzimas propias de los Trichodermas, mediante el uso de plasmidios incorporar a las plantas los genes de tres especies de Trichodermas.

También se describe una pintura cicatrizante de poda a base de látex incluyendo una pasta para ser diluida en agua al momento de su uso, transformándose en una pintura y su procedimiento de preparación, la cual se obtiene por cualquier vía una base de látex, que puede o estar adicionado el color, pero debe estar libre de fungicidas químicos, luego por cada 60 litros de base látex libre de agentes fungicidas, se adicionan 100 gramos de la composición de la presente invención que comprende una mezcla de dos o más especies de Trichodermas en distintas fases de crecimiento vegetativo y metabólico, más específicamente una mezcla de tres especies de Trichoderma, contenidas en un soporte nutritivo micro ionizado y se integra, se revuelve por cualquier método (incluido el manual) hasta obtener una solución homogénea. Definido el color que se dará al látex se agregan 10 gramos de colorante vegetal y/o orgánico y/o inorgánico previamente disuelto en 1 litro de agua caliente. Dependiendo de la tonalidad que se requiera, la cantidad de colorante puede subir o bajar.

La composición de la presente invención se obtiene por un procedimiento de preparación que comprende:

- a) Siembra inicial sobre bandejas que contienen el micro nutriente, micro ionizado estéril e hidratado en un extracto hidroalcohólico de Rubus sp, con tres especies de Trichodermas a la forma de propágulos madres en la proporción de: Trichoderma Harziano 50%, Trichoderma Viridae 30% y Trichoderma Longibratum (ya irradiado),
- b) Rangos críticos, el cultivo se maneja dentro de los siguientes rangos, pH 5 con temperatura de 17° C a 22 °C, con exposiciones de foto periodos interrumpidos,

- c) Capacidad del nutriente de absorber, contener y entregar (en solución acuosa) las secreciones volátiles producto de la repulsión mutua de las especies Harziano y Viride y las no volátiles de Trichoderma Longibratum junto a su capacidad antibacteriana aportado por las sustancias de naturaleza bactericidas bacteriostáticas contenidas en el extracto hidroalcohólico de Rubus sp,
- d) La presencia de Trichoderma Longibratum en el cultivo permite una liberación controlada de secreciones antagónicas y de carácter fungí entomocida bactericidas bacteriostáticas por parte de el y de las especies de Trichodermas Viride y Harziano, evitando que se aniquilen entre sí y manteniendo un crecimiento vegetativo en todas sus fases de desarrollo y con todas sus funciones metabólicas de las tres especies en el micro nutriente que contienen extracto hidroalcohólico de Rubus sp,
- e) La cosecha de la biomasa generada implica la recolección total de esta por medio mecánico, entre los días 4 y 7, su resiembra se hace desde este punto utilizando material vivo en todas sus fases de crecimiento vegetativo al 1% o más con respecto al nutriente ya hidratado sobre bandejas de cultivo.

Un método para proteger plantas, suelos, semillas árboles y/o frutos contra el daño de una peste de insectos, bacterias, hongos, virus y/o una combinación de dos o mas de estos agentes, que comprende plantar una planta o árboles transgenico, que expresan una sustancia específica de naturaleza entomocida, fungicida, bactericida bacteriostático, nematicida, y/o otras enzimas propias de los Trichodermas dentro de un área en la que puedan presentarse dichas pestes.

Además en la presente invención se describe un método para producir progenie transgenica de una planta parenteral transgenica, que comprende incorporar en forma estable y permanente dentro del genoma de la planta una molécula de ADN y o ARN que comprenda una secuencia de nucleótidos codificantes de una proteína específica de Trichoderma de acuerdo con la presente invención, en el cual se transforma dicha planta parenteral con un casete

26 JUL 2002

de expresión o molécula vector y transferir el carácter de funguicida ,entomocida (fases adulto como larvales), bactericida bacteriostático a la progenie de dicha planta parenteral transgenica involucrando técnicas conocidas de mejora de plantas.

Así también en la presente invención se describe un método para identificar la actividad de insectos, hongos, nematodos, bacterias y combinaciones de estos agentes que comprende :

- a. Crecimiento de una o mas cepas de Trichodermas (incluyendo Harziano, Viride ; Longibratum) en un cultivo, pudiendo o no estar presente el extracto de Rubus sp., o cualquier extracto vegetal de naturaleza bactericida bacteriostático,
- b. Obtener fracciones sólidas, liquidas y/o secreciones volátiles ,
- c. Permite que larvas de insectos ,bacterias, virus , hongos entren en contacto y/o se alimenten de dicha fracción del cultivo y
- d. Determinar la mortalidad.

Además en la presente invención se describe un método para producir y/o formular cualquier producto funguicida bactericida bacteriostático de amplio espectro con acción foliar, radicular, vascular y sobre frutos (incluso ya cosechados) usado en fase preventiva y/o curativa incluso sobre tierra desnuda y/o compost incluyendo cualquier superficie que permita el crecimiento vegetal en base a la mezcla de dos o mas especies de Trichodermas que comprende:

- a) el crecimiento de una o mas cepas de Trichodermas (incluyendo viride, harziano y longibratum) sobre un cultivo sólido,
- b) la elección de avena como materia prima y/o cualquier derivado de esta en forma pura o en mezcla en cualquier proporción, capaz de disparar el crecimiento de dos o mas especies de Trichoderma, pudiendo o no contener un extracto hidroalcoholico de Rubus sp y/o extracto vegetal o de cualquier origen con potencial bactericida bacteriostático que no afecte el crecimiento de los Trichodermas, con similares propiedades.

Adicionalmente en la presente invención se describe una composición que comprende dos o más especies de Trichodermas naturales o modificadas genéticamente, por métodos radiactivo u otra forma, cepas madre de especies y/o sub especies de Trichodermas naturales o de laboratorio, a la cual se adiciona un extracto hidroalcohólico total de Rubus sp, o algunos de sus componentes, en mezcla con sustancias naturales y/o químicas tendientes a obtener una propiedad bactericida bacteriostática y/o preservante, siendo dicha composición:

- a. Una composición formulada sobre la base de dos o mas cepas de Trichodermas, con adición de cualquier sustancia sintética, orgánica, inorgánica, incluyendo los preservantes y/o prepulsores de estas sustancias destinada a dar una característica bactericida bacteriostática y/o cualquier sustancia funguicida en dosis menores a las necesarias para matar el cultivo de Trichodermas, o sustancias funguicidas a las cuales las especies de Trichodermas seleccionadas resulten inmunes, pero lo suficientemente potente para otorgarle un carácter de funguicida a dicha preparación, como también la incorporación de sustancias de cualquier origen y naturaleza y/o inductoras de acción bactericida bacteriostática (incluyendo penicilina como extracto impuro del hongo prepulsor y o de procedencia comercial, macrolídos neomacrolídos, ciclosporina y cualquier otra familia terapéutica de bactericida bacteriostáticos funguicida ya disponible en el mercado o que pudiera estar disponible en los próximos años).
- b. Una composición formulada sobre la base de dos o mas especies de Trichodermas vivas y activas que por su carácter antagónico deben tener una presentación comercial separada, pero deben ser mezcladas al momento de ser usada en forma inmediata o en un plazo no mayor a los 45 días post aplicación de la primera especie, todo esto con el fin de conseguir un espectro de acción mas amplio al otorgado por una especie cualquiera

26 JUL 2002

10

que sea esta y de cualquier origen posible en cualquier fase de crecimiento vegetativo, pudiendo o no contener agentes que le otorguen las propiedades adicionales de bactericida bacteriostático

La presente invención además se refiere a una formulación funguicida bactericida bacteriostática de amplio espectro con acción sobre hongos y/o bacterias que son responsables de enfermedades fungosas y/o bacteriosis sobre humanos y/o animales, como también sobre bacteriosis y/o hongos que pueden infectar alimentos, evitando así su crecimiento y/o en fase curativa sobre bacterias y/o ya instalados, usado en fase preventiva y/o curativa, la cual consiste en una presentación comercial para repostería que permite introducir una o más cepas de Trichoderma vivas y/o extracto de estas teniendo como principio activo lactonas en una concentración suficientes que permitan inhibir el crecimiento de hongos (como por ejemplo penicilinium y otros) sobre el pan en particular y masa en general, una vez cocinado, alargando así su vida útil.

Además se refiere a una presentación comercial para su uso en medicina humana, que puede contener como principio activo una o mas especies vivas de Trichodermas , extractos de estas (lactonas), combinación de ambas y/o lactonas de cualquier origen (sintética o extractos orgánicos puro y/o impuros) en un medio, liquido, polvo, fosfolipídico (incluyendo liposomas),crema, supositorios, comprimidos, cápsulas, colutorios, soluciones oftálmicas y otros aceptados en fármaco técnica y a concentración suficiente que permitan realizar una acción preventiva y o curativa sobre los hongos responsables de enfermedades en humanos, mamíferos en general, aves y peces.

EJEMPLO 1

Procedimiento de preparación de la composición que comprende dos o más especies vivas de Trichoderma.

Se identifican y seleccionan las cepas de *Trichoderma viride*, *Trichoderma Longibratum* y *Trichoderma Harziano*, posteriormente se procede a cultivarlas en un bioreactor tradicional alimentado con glucosa – maltosa para obtener una solución acuosa rica en secreciones pero pobre en biomasa de Trichodermas y luego se realizo un tamizado que permitió recoger las esporas presentes en este cultivo.

Las esporas de estos hongos fueron cultivadas sobre una capa de avena previamente esterilizada por medio de una exposición controlada de microondas y levemente hidratada hasta llegar a aislar en frascos separados cada especie.

Para evitar la aniquilación de las especies al estar cohabitando juntas en el cultivo, se realizo una transformación mediante la exposición a radiación de la cepa de *Trichoderma Longibratum*, transformándola por selección inducida en una cepa resistente a las secreciones fungicidas que liberan las dos especies de Trichodermas que contiene el producto final. Más específicamente, las especies madres de *Trichoderma Longibratum* fueron sometidas a micro exposiciones de cobalto durante 50 generaciones, obteniéndose una cepa de características únicas.

Posteriormente al sustrato se incorpora extracto de *Rubus sp*, en una concentración no inferior a 0,68 mg/ml.

EJEMPLO 2

Composición que comprende dos o más especies vivas de *Trichoderma*.

Composición que comprende *Trichoderma Harziano*, *Trichoderma Viride* y *Trichoderma Longibratum* en las proporciones: 10:20:70 o 99:05:05.

EJEMPLO 3

Procedimiento de preparación de la composición a base de látex y de dos o más especies vivas de *Trichoderma*.

26 JUL 2006
CENIA
11

Se mezclan 60 litros de una base de látex, que puede o estar adicionado el color, con 100 gramos de la composición del ejemplo 1 y se revuelve por cualquier método (incluido el manual) hasta obtener una solución homogénea. Definido el color que se dará al látex se agregan 10 gramos de colorante vegetal y/o orgánico y/o inorgánico previamente disuelto en 1 litro de agua caliente. Dependiendo de la tonalidad que se requiera, la cantidad de colorante puede subir o bajar.

EJEMPLO 4

Composición a base de látex que comprende dos o más especies vivas de Trichoderma.

Composición a base de látex que puede o no estar adicionado el color, que comprende por cada 60 litros de base látex 100 gramos de la composición del ejemplo 1.

REIVINDICACIONES

1.- Composición bactericida, bacteriostática y fungicida CARACTERIZADA porque comprende dos o más especies vivas de Trichodermas.

2.- Composición de acuerdo con la reivindicación 1 CARACTERIZADA porque comprende dos o más especies de Trichodermas naturales o modificadas genéticamente, cepas madre de especies y/o sub especies de Trichodermas de cualquier origen natural o de laboratorio, vivas y activas en cualquiera de sus fases de crecimiento vegetativo, esporas micelio, fraccionado o en distintas proporciones.

3.- Composición de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 2 CARACTERIZADA porque comprende dos o más especies de Trichodermas seleccionadas entre Trichoermas harzianum, viride, polysporum, longibratum, koningii y variaciones de estas obtenidas en laboratorio identificadas como T22, Tr 115, Tr 116,KRL-AG2 (Rifai), incluyendo holoformas como Hypocrea y Podostroma.

4.- Composición de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 3 CARACTERIZADA porque comprende tres especies vivas de Trichodermas.

5.- Composición de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 4 CARACTERIZADA porque comprende tres especies vivas de Trichodermas seleccionadas de las cepas Trichoderma viride, Trichoderma Longibratum y Trichoderma Harziano.

26 JUL 2002
12

6.- Composición de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 5 CARACTERIZADA porque las tres especies vivas de Trichodermas se encuentran en las proporciones: 10:20:70 o 99:05:05.

7.- Composición de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 6 CARACTERIZADA porque comprende las tres especies vivas de Trichodermas y un extracto vegetal de naturaleza bactericida bacteriostático.

8.- Composición de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 7 CARACTERIZADA porque el extracto es un extracto hidroalcohólico de Rubus sp.

9.- Composición a base de látex para pintura cicatrizante de poda CARACTERIZADA porque comprende una base de látex, que puede o tener adicionado el color, y una composición de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10.- Composición de acuerdo con la reivindicación 9 CARACTERIZADA porque comprende aproximadamente 60 litros de dicho látex y 100 gramos de dicha composición.

11.- Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10 CARACTERIZADO porque sirve para proteger plantas, suelos, semillas, árboles y/o frutos contra el daño de una peste de insectos, bacterias, hongos, virus y/o una combinación de dos o más de estos agentes.

12.- Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11 CARACTERIZADO porque se aplica en forma de polvo seco o en forma de solución acuosa.

13.- Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12 CARACTERIZADO porque la aplicación se realiza mediante técnica de voleo, en impregnación de semillas, directamente a las plantas, incorporado a tanques de ferti-riegos, por medio de maquinas espalderas, maquinas pulverizadoras y maquinaria electrostática.

14.- Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13 CARACTERIZADO porque la dosis aplicada es de 1 kilo hectárea o 2 kilo hectárea, por cada 600 litros de agua.

15.- Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10 CARACTERIZADO porque sirve como fungicida bactericida bacteriostático de amplio espectro con acción sobre hongos y/o bacterias que son responsables de enfermedades fungosas y/o bacteriosis sobre seres humanos y/o animales y/o alimentos.

16.- Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 15 CARACTERIZADO porque puede ser utilizada en la fase preventiva y/o en la fase curativa.

17.- Procedimiento de preparación de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 CARACTERIZADO porque comprende una siembra inicial sobre bandejas que contienen el micro nutriente hidratado en un extracto vegetal, con dos o más especies de Trichodermas a la forma de propágulos madres y la cosecha de la biomasa generada por medios mecánicos.

18.- Procedimiento d preparación de acuerdo con la reivindicación 17
CARACTERIZADO porque la siembra comprende tres especies de Trichodermas
a la forma de propágulos madres.

19.- Procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 18
CARACTERIZADO porque las tres especies de Trichodermas son seleccionadas
de las cepas *Trichoderma viride*, *Trichoderma Longibratum* irradiado y
Trichoderma Harziano.

20.- Procedimiento de preparación de acuerdo con las reivindicación 19
CARACTERIZADO porque la proporción de las tres especies es de 50% de
Trichoderma Harziano, 30% de *Trichoderma Viridae* y 20% de *Trichoderma*
Longibratum.

CAREY
S C I A L T D A S
ABOGADOS

PATENTE DE INVENCION
SOLICITUD N° 1665-2002

CONTESTA EXAMEN PRELIMINAR

Sr. Conservador de Patentes

GUILLERMO CAREY CLARO, Abogado, domiciliado en Miraflores 222, Piso 24, comuna y ciudad de Santiago, en representación de **MARIO REYES Y JUAN RENCORET**, en la solicitud de registro de Patente de Invención N° 1665-02, para distinguir “Composición bactericida, bacteriostática y fungicida que comprende de dos o más especies vivas de trichodermas, composición cicatrizante de poda que lo contiene, procedimiento de preparación y sus usos”, a Ud. respetuosamente digo :

Según resolución dictada y notificada con fecha 08/05/03, vengo en acompañar memoria descriptiva y poder.

POR TANTO

RUEGO A UD.: tener por acompañados los documentos antes mencionados, a fin de continuar con la tramitación de la solicitud de autos.

CM 1665-02



MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención describe una composición bactericida, bacteriostático y funguicida en polvo en base a la coexistencia, cohabitación y repulsión mutua de dos o más especies vivas de Trichoderma y su procedimiento de preparación.

La composición de la presente invención permite un control funguicida y bacterial sobre la mayoría de los fitopatógenos de importancia agrícola a nivel foliar, radicular, vascular y/o en frutos. Además es un producto soluble en cualquier tipo de agua, utilizándose para un tratamiento curativo y/o preventivo tanto en semilla, plantas, árboles ornamentales y/o frutales, frutos y/o tierra.

Las especies de Trichoderma fueron descubiertas a fines de los años 1940 y desde ese momento se ha estado explorando su potencial como hongo antagonista de hongos fitopatógenos. Actualmente se conocen mas de 400 especies de Trichoderma, las cuales son de fácil aislamiento, pero de difícil cultivo.

La actividad antagonista por espacio y nutrientes frente a hongos fitopatógenos e inclusive frente a especies de Trichoderma, razón por la cual no existen mezclas de dos o más especies de Trichodermas vivos, esta ampliamente documentada tanto en Europa como en centros de investigación Americanos.

El desarrollo de Trichoderma hasta ahora está frenado debido a la imposibilidad de encontrar una técnica que permita su cultivo masivo y debido a que solo puede existir una especie de Trichoderma por cultivo.



La forma actual de obtener una especie de Trichod rma a la forma de esporas, se r aliza mediante el cultivo fermentativo en bioreactores, para posteriormente liofilizar y filtrar la materia obtenida por un tamiz que deje pasar solo las esporas. La otra forma es inocular harinilla de trigo con una especie de Trichoderma y luego diluirlo usando tierra de diatomeas y/o una matriz arcillosa. Estos dos métodos son de baja productividad y no permiten por las características antagónicas de las especies de Trichodermas, la producción de dos o más especies juntas y por lo tanto no existe posibilidad de obtener enzimas líticas, ya que estas solo se producen en presencia de otro hongo.

Las especies de Trichodermas ejercen una actividad antagónica violenta frente a otros hongos incluyendo de su misma especie mediante el siguiente mecanismo:

- A. Liberación de enzimas volátiles que desnaturalizan y digieren la estructura del hongo con el cual compiten.
- B. Rápido anclaje en el sustrato lo que permite que las estructuras reproductivas del hongo (esporas) con el cual compiten no logren ser viables.
- C. Establecimiento de una simbiosis con una planta o estructura vegetal viva a la cual microparasitan y liberan sustancias beneficiosas para el hospedador, generalmente micro trazas de ácido giberelico y/o estreptomicina en el caso de existir en el hospedador una ataque bacteriano leve.

Los preparados madres que existentes actualmente en el mercado internacional como nacional son obtenidos por crecimiento vegetativo de una



especie de Trichoderma sobre fase sólida y/o agar papa dextrosa. Posterior a esto se realiza una inoculación en germen de trigo, paja, harinilla, tierra de diatomeas y/o matriz arcillosa. El producto formulado solo contiene esporas inactivas de una especie de Trichoderma en un excipiente inerte generalmente tierra de diatomeas.

Debido a las características de su obtención debe mantenerse en una línea de frío hasta su uso, de otra forma se desnaturaliza, pudiendo entrar en fase de descomposición rápidamente.

El producto obtenido por esta vía solo puede ser usado en fase preventiva, ya que los propágulos de una especie de Trichoderma deben desarrollarse para comenzar a realizar su acción antagónica sobre patógenos, el que generalmente es uno, a controlar.

El producto formulado al estar constituido por una especie de Trichoderma tiene un espectro de acción muy reducido sobre complejos de hongos fitopatógenos. Y además si la población de fitopatógenos presentes es muy alta, el producto no es capaz de controlarlos pues la agresividad del fitopatógeno impide el desarrollo de las esporas de Trichoderma, el cual es el principio activo del producto.

La actividad de la especie de Trichoderma contenido en la formulación del producto como principio activo, al ser aplicado en el campo se ve restringida tanto en su fase metabólica como crecimiento vegetativo por factores ambientales, tales como el pH de agua, la tierra, la actividad de fungicidas químicos, el vientos que lo deshidratan, etc., como también por la ubicación de los fitopatógenos a controlar teniendo nula acción sobre patógenos radiculares y



medulares y acción errática, principalmente por las condiciones ambientales, sobre fitopatógenos de fruto y follaje.

El producto formulado de esta forma tiene cero acción sobre patologías vasculares, pudiendo ser medianamente efectivo solo si se perfora los troncos para inocular el preparado a la forma de bala y/o inyección.

En los últimos años han surgido intentos por facilitar y masificar su uso, existiendo en el mercado mundial preparados que contienen una especie de Trichoderma en forma de balas, para enfermedades de tipo vascular, que deben ser aplicadas post perforación del tronco del árbol, con el consiguiente estrés para el vegetal, junto con diseminar la enfermedad al retirar la broca con la que se realizó la perforación del tronco y que actúa como sonda al ir inoculando territorios sanos durante el proceso de penetración y posterior retiro de esta.

El uso de esta formulación está restringido a especies arbóreas y/o leñosas, y el método no es aplicable a cultivos menores como lo son los hortofrutícolas como por ejemplo la remolacha, lechuga, frutillas, etc.

También existen composiciones que comprenden una de una especie de propágulos de Trichodermas en solución acuosa, la cual se deteriora rápidamente dentro de un plazo de horas, aun en envases sellados, debido a la rápida proliferación de bacterias, otorgándole un olor penetrante y característico de la pudrición. El mismo olor está presente en preparaciones sólidas cuya cadena de frío fue rota.

Las composiciones de Trichoderma disponibles en el mercado comprenden una especie de Trichoderma, generalmente el Harziano en la forma de propágulos (esporas), no existiendo mezclas de dos o más especies de



Trichodroma cohabitando juntos en un medio de naturaleza bactericida y bacteriostático, debido a su naturaleza antagonista ya descrita.

En el estado de la técnica no existen antecedentes que demuestren su uso potencial en medicina humana como veterinaria para el control de bacterias y/o hongos oportunistas.

En el documento AU 8479301 se describe una la producción y el uso de enzimas inducidas desde Trichodermas y bacterias para el control de pestes de plantas y para procesos industriales. En este documento a diferencia de la presente invención se utilizan bacterias para controlar bacterias.

En el documento NZ 335107 describe Trichoderma celulasa aislada desde un cultivo de Trichoderma longibrachiatum con un peso molecular estimado de 95-105 kD. En este documento a diferencia de la presente invención se obtienen Trichoderma longibratum y otras especies por vía fermentativa y las isoenzimas se encuentran contenidas en el caldo de cultivo y deben ser purificadas, a cada especie le corresponde un fermentador individual ya que no cohabitan juntas.

En el documento US 2028500 se describe un proceso para la preparación de nuevos medios de cultivo para plantas para su multiplicación de bio-control fúngico. En este documento a diferencia de la presente invención solo podrían llegar a vivir juntas dos o mas variantes de una misma cepa en restos fermentativos.

En el documento CA 2304107 se describe un proceso para proveer impregnabilidad a la madera por medio de un pretratamiento con fúngicos. En este documento a diferencia de la presente invención se identifica un método



para proteger árboles transgénicos del ataque de hongos, no de insectos y bacterias.

En el documento WO 0183706 se describe un pesticida microbiológico activo contra patógenos fúngicos de plantas y su procedimiento de preparación. En este documento a diferencia de la presente invención el producto es en base de esporas, micelio, o mezcla con características de fungicida usando solo *Trichoderma harzianum* YC459 (accesión 0772BP).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se describen composiciones que comprenden una combinación de dos o más especies de Trichodermas naturales o modificadas genéticamente, por métodos radiactivos u otra forma, cepas madre de especies y/o sub especies de Trichodermas de cualquier origen natural o de laboratorio, vivas y activas en cualquiera de sus fases de crecimiento vegetativo, esporas micelio, fraccionado o en distintas proporciones.

Más específicamente en la presente invención se describen composiciones que comprenden una combinación de tres especies de trichodermas naturales o modificadas genéticamente, por métodos radiactivos u otra forma, cepas madre de especies y/o sub especies de Trichodermas de cualquier origen natural o de laboratorio, vivas y activas en cualquiera de sus fases de crecimiento vegetativo, esporas micelio, fraccionado o en distintas proporciones.

En la presente invención se identifican y seleccionan las cepas de *Trichoderma* que presentan por separado un poder antagónico frente a un



numero determinado de hongos fitopatógenos de interés económico. La identificación de las cepas madres se realizó de acuerdo a los criterios que definen a cada especie contenidos en: "Moulds, their isolation, cultivation and identification", 1981, Dr. David Malloch, University of Toronto". De acuerdo a este criterio las cepas seleccionadas fueron: *Trichoderma viride*, *Trichoderma Longibratum* y *Trichoderma Harziano*.

Posteriormente se procedió a cultivarlas en un bioreactor tradicional alimentado con glucosa – maltosa con fines de obtener una solución acuosa rica en secreciones pero pobre en biomasa de Trichodermas. Análisis químicos permitieron determinar la presencia de iso enzimas líticas que corresponden a : Carboxymetilcelulasa, quitanasa, beta 1, 3 gluconasa, beta xylosidasa, xylanasa y 6pentilalfa pirona. Establecida la presencia de las sustancias anteriormente descritas, se realizó un tamizado que permitió recoger las esporas presentes en este cultivo.

Las esporas de estos hongos fueron cultivadas en una serie de preparaciones de acuerdo a las indicaciones contenidas en el : "Moulds, their isolation,cultivation and identification", 1981 , Dr. David Malloch, University of Toronto, hasta llegar a aislar en frascos separados cada especie.

Se establece la necesidad de mantener dos o más especies vivas y cohabitando juntas, con el fin último de sinergizar su espectro de acción frente a fitopatógenos, como también la necesidad de contar con altas concentraciones de las isoenzimas líticas ya descritas que le otorgarian un poder curativo al producto final, se comenzó por seleccionar un medio de cultivo sólido que permitiera el crecimiento armónico y rápido de dos o más especies y que fuera



capaz de absorber las secreciones liberadas por estas especies cuando se agredieran mutuamente y posteriormente cederlo en solución acuosa. El medio seleccionado fue la avena, que para evitar la contaminación, previamente se esteriliza y luego se incorpora en el cultivo.

Para evitar la aniquilación de las especies al estar cohabitando juntas en el cultivo, se realizo una transformación mediante la exposición a radiación de la cepa de Trichoderma Longibratum, transformándola por selección inducida en una cepa resistente a las secreciones fungicidas que liberan las dos especies de Trichodermas que contiene el producto final. Más específicamente, las especies madres de Trichoderma Longibratum fueron sometidas a micro exposiciones de cobalto durante 50 generaciones, obteniéndose una cepa de características únicas.

El micro nutriente se selecciona después de haber ensayado con los distintos medios y combinaciones posibles de estos . La avena resultó ser el medio donde las dos o más especies de Trichodermas se desarrollaron de manera mas eficiente, además que era capaz de contener y posteriormente ceder en solución acuosa las isoenzimas líticas.

La realización del cultivo definitivo se hace sobre una capa de avena levemente hidratada, la cual fue inoculada con una mezcla de dos o más especies. La avena micronizada, es sometida a esterilización por exposición controlada de microondas para evitar la degradación de fructosa contenida en su germen.

La avena micronizada como micro nutriente cumple las siguientes funciones:



Soport físico: permite al hongo crecer en su superficie, pudiendo establecer a simple vista la presencia de algún otro patógeno no deseado o cambios mutágenos de estas especies no deseadas.

Soporte nutricional: Entrega a los hongos todos los requerimientos nutricionales para su desarrollo.

Aislante térmico: Durante el proceso de crecimiento de los hongo se realizan una serie de reacciones exotérmicas producto del catabolismo de estos y de reacciones que ocurren entre las distintas enzimas que liberan y el ataque de estas a los azúcares contenidos en la avena.

Solución Tampón: El producto final en solución acuosa, actúa como una solución tampón, para aguas alcalinas.

Esponja: Durante la etapa de cultivo de las dos o más especies de Trichoderma, que dan origen al producto final, la avena es capaz de absorber las secreciones líticas que liberan los Trichoderma durante el proceso de antagonismo. Estas secreciones ahora contenidas en la avena, son de naturaleza hidrosolubles, por lo cual en solución acuosa se integran a ella, abandonando la matriz de avena casi en su totalidad.

Regulador del intercambio nitrógeno amonio en la estructura vegetal a proteger.

Absorbente y transportador de las isoenzimas solubles en agua, que liberan las dos o más especies de Trichodermas al agredirse mientras cohabitán el mismo espacio.

Además al sustrato se incorpora extracto de Rubus, lo cual permite por un lado dar a la composición una condición de bactericida bacteriostático, como



también permite al cultivo estar libre de contaminación por bacterias oportunistas. La adición de extracto hidroalcohólico de Rubus sp al micro nutriente, se realiza en una concentración no inferior a 0,68 mg/ml.

Para aumentar aun más su espectro de acción se selecciona al extracto hidroalcohólico de Rubus sp, cuyos componentes han demostrado una importante acción bactericida bacteriostática. El producto generado resulta de un poder fungicida bactericida bacteriostático por las secreciones aportadas y la actividad desarrollada por las especies de Trichodermas contenidas. La acción entomocida resulta de la invasión al sistema digestivo, respiratorio de larvas , ninfas , adultos y/o al infestar al huevo de distintas especies, también se ha reportado que la acción entomocida se ve potenciada por el extracto hidroalcohólico de Rubus, que tiene características bactericidas bacteriostáticas, y por lo tanto también teratogénicas para los insectos que son expuestas a ellas, no siendo viable los huevos en contacto con estas sustancias y/o la ovipostura realizadas por hembras que tuvieron contacto con el producto en si.

Además se pueden utilizar otros extractos vegetales, tales como:
Oenothera rosea Aut., *Alaysia triphylla* (L. Herit) Brit., *Arenaria licopodioides* Wiild. Ex Schdl. Y *Erodium cicutarium* (L.) L. Herit, *Birsonima cassifolia*, *Citrus limonia*

La especie de Trichoderma, corresponde a hongos de tipo filamentoso, que son antagónico con otros hongos, incluyendo a los de su misma especie, como: harzianum, viride, polysporum, longibratum, koningii, principalmente y variaciones de estas obtenidas en laboratorio identificadas como T22, Tr 115, Tr 116,KRL-AG2 (Rifai), incluyendo holoformas como Hypocrea, Podostroma, la



mayoría de las subespecies seleccionadas de acuerdo al grado de agresividad y capacidad de supervivencia en condiciones de campo. Sin embargo lo que se desea proteger no es la combinación de 2 o más especies de Trichoderma, pues esta existe en la naturaleza, y en preparaciones de tipo comercial, sino que se desea proteger la combinación de 2 o más especies vivas de Trichodermas en cualquier fase de crecimiento vegetativo, capaces de liberar enzimas líticas de repulsión, crecer juntas en un medio de cultivo y ser inmunes a las condiciones ambientales de tal forma que puedan ejercer su acción controladora por un plazo no inferior a un día.

Las especies que conforman la composición corresponden a subespecies seleccionadas por su alta adaptabilidad a las condiciones fluctuantes del medio ambiente, lo que les permite mantenerse vivas.

Más específicamente las tres especies de Trichodermas seleccionadas corresponden a Trichoderma Harziano, Trichoderma Viride y Trichoderma Longibratum.

Las composiciones que comprenden las de tres especies de Trichodermas vivas se encuentran en las siguientes proporciones: 10:20:70 o 99:05:05.

La composición corresponde al extracto hidroalcohólico de Rubus sp. y las secreciones específicas contenidas en el micro nutriente post crecimiento vegetativo y metabólico de las especies de Trichoderma junto al Trichoderma vivo resistente a factores ambientales, las secreciones son capturadas por el método descrito y posteriormente cedidas en solución acuosa.



La composición contiene a) enzimas líticas Carboxym tilcelulasa, Quitinasa, b1,3 gluconasa, b xylosidasa , xylanasa, b) alta concentración de 6 pentil alfa pirona (lactona volátil que desprende un penetrante aroma a coco, dependiendo de la concentración de esta, que le da la característica a nuestro producto), c) Estreptomicina y auxinas en micro trazas, (los metabolitos descritos en a y b son responsables a nivel celular de vacuolación, granulación, lisis y desintegración de la célula expuesta a estas secreciones), d) una concentración no inferior a 0,68 mg/ml de principios activos adicionados en el extracto hidroalcohólico de Rubus sp., que le otorgan el carácter de bactericida y bacteriostático

La acción Bactericida y bacteriostática de muy bajo espectro, esta descrita en varios trabajos (France,et al,2001; Stefanova M,1995 Fernández, 2001) y se debe a la liberación bajo presencia de bacterias de estreptomicina, ejerciendo una acción sobre bacterias sensibles a la estreptomicina, los cuales representan un espectro muy pequeño, razón por la cual se le adiciona al cultivo el extracto de Rubus, que presenta un espectro de acción sobre bacterias muy alto, sin ninguna acción sobre hongos, con lo que se permite un crecimiento sin problemas del Trichoderma.

El *Trichoderma longibratum*, previamente tratado con radioterapia, resultó inmune a las secreciones que liberan las especies harziano y viride.

Estas secreciones se inactivan por la presencia de metabolitos que libera el *longibratum* que cambian el pH del medio permitiendo la absorción de estas por parte de la avena. Estas enzimas son de tipo termolábiles y en la avena se inactivan sin degradarse. Cuando el cultivo a llegado a máximo crecimiento, las



bandejas contenedoras de los hongos son cosechadas e inmediatamente diluidas en sustrato que permite una crecimiento mas lento del hongo y una dilución de las enzimas que pudieran llegar a afectar las estructuras de los hongos durante el periodo de envejecimiento del producto.

Al estar en condiciones distintas a las del cultivo, como por ejemplo como producto ya envasado, la tasa de crecimiento decrece dramáticamente.

Las especies que conforman la composición corresponden a subespecies seleccionadas por su alta adaptabilidad a las condiciones fluctuantes del medio ambiente, lo que les permite mantenerse vivas. Esta adaptabilidad le permite ejercer su acción antagonista frente a los hongos fitopatógenos durante el lapso de 20 días. Las secreciones contenidas en el micronutriente, contenidas en una concentración biológicamente activas, son de dos tipos:

Funguicidas: Aportadas por Trichodermas y representadas principalmente por 6 pentilalfa pirona, carboxymetilcelulasa, quitinasa, beta 1,3 gluconasa, beta xylosidasa y 1,4beta xylanasa, que destruyen la estructura del hongo patógeno.

Bactericida Bacteriostático: aportadas por el extracto hidroalcoholico de Rubus representada principalmente por los constituyentes químicos pueden ser observados según Costa (1994), ácidos libres, sustancias pépticas, ácidos ascórbico, fólico, acético, caproico y benzoico, así como, cumarinas. A esto deb sumarse la estreptomicina que liberan los Trichodermas en presencia de bacterias.

Las secreciones contenidas, el micro nutriente y la biomasa de Trichodermas activas y vivas, debido a su amplio espectro fungicida bactericida bacteriostático y entomocida ejercen acciones:



Curativa: al mezclar el producto en agua, el micro nutriente libera todas las secreciones contenidas en el, las que son solubles en agua, también los Trichodermas vivos y activo en todas sus fases de crecimiento. Estas secreciones son fungicidas de mayor potencia que los derivados de las familias de fungicidas químicos. También el aporte de sustancias contenidas en el extracto hidroalcohólico de Rubus sp. otorgan las características de bactericida bacteriostático al producto formulado.

La estructura madre de las lactonas ($R=C_2H_5$ y $R=CH_3$) presenta dos sitios activos de unidad biológica lo que permite una acción de contacto, pero también una acción translaminar, pudiendo llegar el centro de la hoja manteniendo un medio no propicio para la proliferación de patógenos. Esta estructura en los insectos también provoca la liberación del ácido gamma aminobutírico, induciéndose una migración masiva de iones cloruros al interior de la células de los insectos induciendo una parálisis que provoca su muerte. Las otras secreciones líticas ya descritas afectan la estructuras de hifas y unidades reproductivas de los hongos, manteniendo una actividad sostenida por espacio de 15 días antes de comenzar a degradarse.

Los fungicidas tradicionales tienen en sus moléculas un sitio activo de actividad biológica, por lo que es más fácil que los hongos adquieran una resistencia y las plagas muten, obteniendo así resistencia / tolerancia debido a que la plaga está expuesta a una variable .

Se realizaron pruebas de campo en distintas plantas afectadas con rhizostonia, fusarium, plateado, esclerotinia, botrytis, cáncer bacterial, infección por pseudomonas, todas ellas en un grado de avance cuya única indicación era



arrancar las plantas. Se realizo tratamiento en dosis de 2 kilos de la composición de la presente invención por hectárea con dilución en hasta 600 litros de agua, fue aplicada con bombas espalderas y/o maquinaria, dependiendo de la extensión afectada como también del tipo de vegetal. La evaluación se realizo a los 2 días visualizándose una inhibición del crecimiento del patógeno(s) que estaba(n) presente en la(s) planta(s). Se mantuvo un control de la experiencia por espacio de 26 días, determinándose que al día 21 la acción de la composición comenzada a decaer, manifestándose un crecimiento de los patógenos y/o nueva reinfección, obteniéndose al día 26 un control inferior al 60% de la población de fitopatógenos. Este margen de control permitió para fines comerciales establecer una dosis de acción curativa de 2 kilos de la composición formulada con dilución en cualquier tipo de agua de hasta 600 litros, brindando un efecto residual de 20 días.

Curativa y preventiva: En cultivos que históricamente habían tenido perdidas por ataques fungobacterianos, a pesar de uso de funguicidas químicos, se aplico la composición de la presente invención en dosis de 1 kilo por hectárea con mojamiento de hasta 600 litros de agua. En semillas se estableció que el porcentaje histórico de caída de plantas por ataques de complejos de hongos (dumping off) se redujo de 40% a 5% con el uso de la composición. En cultivos mayores (frutales) y menores (hortalizas), se establece que aplicando la composición de la presente invención dos o tres días antes de una lluvia y/o inmediatamente posterior a ella se reduce el porcentaje de ataque de hongos oportunistas (oidio, botrytis, midiu, esclerotinia, cladiosporum) de un 90% a 3%



con el uso de la composición, manteniendo el control por espacio de 20 días (efecto residual).

La acción curativa y preventiva de la composición de la presente invención es frente a fitopatógenos únicos o asociados a complejos de hongos y/o asociaciones hongo bacterias, tales como botrytis, oidio, plateado, enrollamiento clorótico, rhizostonia, raíz corchosa, cáncer bacterial, cladiosporum, fusarium, pudrición ácida, armilaria, tapiar cerasi, monilinia, verticillium, roya, agrobacterium tumefaciens, citosporiosis, wilsonomyce carpophilus, phytophthora, elsinoe veneta, septoria rubi, fumagina, didymella sp, erwinia sp, alternaria sp, sclerotinia, mildiu, macrophomina sp, bacterios aeróbicos y anaeróbicos sensibles a la estreptomicina, en general macrólidos, ciclosporinas en particular y/o al extracto de Rubus sp.

La acción preventiva de la composición de la presente invención se obtiene al desnaturalizarse las enzimas fungicidas, las especies de Trichodermas ya han colonizado el área y comienzan su acción antagónica frente a poblaciones de hongos que pudieron quedar como también evitando la nueva re infestación de estos por espora que pudieran llegar por factores ambientales y/o por labores de labranza.

La acción insecticida o entomocida de la composición de la presente invención esta descrita para las especies de lepidoptera como rhyacionia buoliana, y otros insectos patógenos como por ejemplo margaroe sp, de ciclo larval completo o incompleto sensibles a las exotoxinas liberadas por la composición. Estas infectan el huevo haciéndolo no viable, pudiendo incluir



llegar a infectar al individuo cuando se alimenta de vegetales contaminados con estas micotoxinas.

La composición de la presente invención que comprende dos o más especies de Trichoderma activos y vivos en distintas etapas de crecimiento vegetativo junto a las secreciones contenidas en el nutriente previamente hidratado con una concentración de extracto hidroalcohólico de Rubus sp., que pasa a llamarse excipiente biológico activo permite un:

Control de fitopatógenos medulares y/o vasculares, bacteriales aislados o en complejos, hongos aislados o en complejos y/o complejo de hongos bacterias, solo por aplicaciones foliares y riego por goteo, sin necesidad de realizar perforaciones para introducir producto.

Control secundario sobre nematodos al aumentar la masa radicular de las plantas y al bajar también medio grado de temperatura de gestación de los nematodos.

Control de fitopatógenos aéreos por aplicaciones foliares, bacteriales aislados o en complejos, hongos aislados o en complejos y/o complejos de hongos bacterias. Se realizaron aplicaciones para determinar dosis, espectro de acción y residualidad del producto formulado. La presencia de estreptomicina y de los principios activos contenidos en Rubus sp, resultaron a nivel de laboratorio los responsables del control bactericida y bacteriostático. A medida que avanza el daño en una planta y/o fruto producto de la infectación primaria de un hongo, normalmente es campo fértil para que lleguen a cohabitar otros organismos oportunistas, incluidos insectos. Las pruebas realizadas en campo con una dosis de 1 a 2 kilos (según gravedad del ataque, siempre con dilución



máxima de 600 litros agua) de la composición de la presente invención por hectárea aplicada con bomba espaldera y/o maquinaria directamente a follaje y fruto, permitió verificar la acción erradicadora de la composición, la cual se mantuvo por espacio de 20 días.

Control de fitopatogenos radiculares en aplicaciones de riego por goteo, bacteriales aislados o en complejos, hongos aislados o en complejos y/o complejo de hongos bacterias.

Control de fitopatógenos radiculares bacteriales, hongos y/o complejos de hongos bacterias: Lo mismo que para el control de fitopatogenos medulares y/o vasculares, pero en este caso la aplicación se realizó vía riego cintas o riego tecnificado.

Control de fitopatógenos medulares y/o vasculares, bacteriales, hongos y/o complejos de hongos bacterias: Igual que para el control de fitopatogenos medulares y/o vasculares, aquí la aplicación es 2 kilos por hectárea, con mojamiento a follaje y tronco.

Control secundario sobre nematodos: Esta ampliamente documentado que los Trichodermas liberan en forma sostenida ácido gibrelíco, este es un promotor importante de mitosis y meiosis, por lo cual en las plantas se obtiene una mayor masa radicular, que para una población constante de nematodo se traduce en un control secundario de este, por otro lado el micronutriente, contenido en la dilución acuosa, logra bajar en medio grado la temperatura, por lo un porcentaje de huevos de nematodos no son viables.

La composición de la presente invención puede aplicarse a plantas, árboles y/o frutos en forma de polvo seco, mediante técnica de voleo, en impregnación



de semillas, por medio de solución acuosa, directamente a las plantas, incorporado a tanques de ferti-riego, por medio de maquinas espalderas, maquinas pulverizadoras y maquinaria electrostática. Dependiendo de la severidad del ataque la dosis son 1 kilo hectárea o 2 kilo hectárea, por cada 600 litros de agua.

Además se describe un método para proteger plantas, suelos, semillas, árboles y/o frutos contra el daño de una peste de insectos, bacterias, hongos, virus y/o combinación de dos o más de estos agentes, que comprende plantar una planta o árboles transgenicos que expresan una sustancia específica de naturaleza entomicida, fungicida, bactericida, bacteriostático, nematicida y/o otras enzimas propias de los Trichodermas, mediante el uso de plasmidos incorporar a las plantas los genes de tres especies de Trichodermas.

También se describe una pintura cicatrizante de poda a base de látex incluyendo una pasta para ser diluida en agua al momento de su uso, transformándose en una pintura y su procedimiento de preparación, la cual se obtiene por cualquier vía una base de látex, que puede o estar adicionado el color, pero debe estar libre de fungicidas químicos, luego por cada 60 litros de base látex libre de agentes fungicidas, se adicionan 100 gramos de la composición de la presente invención que comprende una mezcla de dos o más especies de Trichodermas en distintas fases de crecimiento vegetativo y metabólico, más específicamente una mezcla de tres especies de Trichoderma, contenidas en un soporte nutritivo micro ionizado y se integra, se revuelve por cualquier método (incluido el manual) hasta obtener una solución homogénea. Definido el color que se dará al látex se agregan 10 gramos de colorante vegetal



y/o orgánico y/o inorgánico previamente disuelto en 1 litro d agua caliente. Dependiendo de la tonalidad que se requiera, la cantidad de colorante puede subir o bajar.

La composición de la presente invención se obtiene por un procedimiento de preparación que comprende:

- a) Siembra inicial sobre bandejas que contienen el micro nutriente, micro ionizado estéril e hidratado en un extracto hidroalcohólico de Rubus sp, con tres especies de Trichodermas a la forma de propágulos madres en la proporción de: Trichoderma Harziano 50%, Trichoderma Viridae 30% y Trichoderma Longibratum (ya irradiado),
- b) Rangos críticos, el cultivo se maneja dentro de los siguientes rangos, pH 5 con temperatura de 17° C a 22 °C, con exposiciones de foto periodos interrumpidos,
- c) Capacidad del nutriente de absorber, contener y entregar (en solución acuosa) las secreciones volátiles producto de la repulsión mutua de las especies Harziano y Viride y las no volátiles de Trichoderma Longibratum junto a su capacidad antibacteriana aportado por las sustancias de naturaleza bactericidas bacteriostáticas contenidas en el extracto hidroalcohólico de Rubus sp,
- d) La presencia de Trichoderma Longibratum en el cultivo permite una liberación controlada de secreciones antagónicas y de carácter fungí entomocidad bactericidas bacteriostáticas por parte de el y de las especies de Trichodermas Viride y Harziano, evitando que se aniquilen entre sí y manteniendo un crecimiento vegetativo en todas sus fases de desarrollo y con todas sus



funciones metabólicas de las tres especies en el micro nutriente que contienen extracto hidroalcohólico de Rubus sp,

e) La cosecha de la biomasa generada implica la recolección total de esta por medio mecánico, entre los días 4 y 7, su resiembra se hace desde este punto utilizando material vivo en todas sus fases de crecimiento vegetativo al 1% o más con respecto al nutriente ya hidratado sobre bandejas de cultivo.

Un método para proteger plantas, suelos, semillas árboles y/o frutos contra el daño de una peste de insectos, bacterias, hongos, virus y/o una combinación de dos o más de estos agentes, que comprende plantar una planta o árboles transgenico, que expresan una sustancia específica de naturaleza entomocida, fungicida, bactericida bacteriostático, nematicida, y/o otras enzimas propias de los Trichodermas dentro de un área en la que puedan presentarse dichas pestes.

Además en la presente invención se describe un método para producir progenie transgenica de una planta parenteral transgenica, que comprende incorporar en forma estable y permanente dentro del genoma de la planta una molécula de ADN y/o ARN que comprenda una secuencia de nucleótidos codificantes de una proteína específica de Trichoderma de acuerdo con la presente invención, en el cual se transforma dicha planta parenteral con un casete de expresión o molécula vector y transferir el carácter de fungicida, entomocida (fases adulto como larvales), bactericida bacteriostático a la progenie de dicha planta parenteral transgenica involucrando técnicas conocidas de mejora de plantas.



Así también en la presente invención se describe un método para identificar la actividad de insectos, hongos, nematodos, bacterias y combinaciones de estos agentes que comprende :

- a. Crecimiento de una o mas cepas de Trichodermas (incluyendo Harziano, Viride , Longibratum) en un cultivo, pudiendo o no estar presente el extracto de Rubus sp., o cualquier extracto vegetal de naturaleza bactericida bacteriostático,
- b. Obtener fracciones sólidas, líquidas y/o secreciones volátiles ,
- c. Permite que larvas de insectos ,bacterias, virus , hongos entren en contacto y/o se alimenten de dicha fracción del cultivo y
- d. Determinar la mortalidad.

Además en la presente invención se describe un método para producir y/o formular cualquier producto fungicida bactericida bacteriostático de amplio espectro con acción foliar, radicular, vascular y sobre frutos (incluso ya cosechados) usado en fase preventiva y/o curativa incluso sobre tierra desnuda y/o compost incluyendo cualquier superficie que permita el crecimiento vegetal en base a la mezcla de dos o mas especies de Trichodermas que comprende:

- a) el crecimiento de una o mas cepas de Trichodermas (incluyendo viride, harziano y longibratum) sobre un cultivo sólido,
- b) la elección de avena como materia prima y/o cualquier derivado de esta en forma pura o en mezcla en cualquier proporción, capaz de disparar el crecimiento de dos o mas especies de Trichoderma, pudiendo o no contener un extracto hidroalcohólico de Rubus sp y/o extracto vegetal o de cualquier origen con potencial bactericida bacteriostático que no afecte el crecimiento de los Trichodermas, con similares propiedades.



Adicionalmente en la presente invención se describe una composición que comprende dos o más especies de Trichodermas naturales o modificadas genéticamente, por métodos radiactivo u otra forma, cepas madre de especies y/o sub especies de Trichodermas naturales o de laboratorio, a la cual se adiciona un extracto hidroalcohólico total de Rubus sp, o algunos de sus componentes, en mezcla con sustancias naturales y/o químicas tendientes a obtener una propiedad bactericida bacteriostática y/o preservante, siendo dicha composición:

- a. Una composición formulada sobre la base de dos o mas cepas de Trichodermas, con adición de cualquier sustancia sintética, orgánica, inorgánica, incluyendo los preservantes y/o prepulsores de estas sustancias destinada a dar una característica bactericida bacteriostática y/o cualquier sustancia funguicida en dosis menores a las necesarias para matar el cultivo de Trichodermas, o sustancias funguicidas a las cuales las especies de Trichodermas seleccionadas resulten inmunes, pero lo suficientemente potente para otorgarle un carácter de funguicida a dicha preparación, como también la incorporación de sustancias de cualquier origen y naturaleza y/o inductoras de acción bactericida bacteriostática (incluyendo penicilina como extracto impuro del hongo prepulsor y/o de procedencia comercial, macrolídos neomacrolídos, ciclosporina y cualquier otra familia terapéutica de bactericida bacteriostáticos funguicida ya disponible en el mercado o que pudiera estar disponible en los próximos años).



b. Una composición formulada sobre la base de dos o mas especies de Trichodermas vivas y activas que por su carácter antagónico deben tener una presentación comercial separada, pero deben ser mezcladas al momento de ser usada en forma inmediata o en un plazo no mayor a los 45 días post aplicación de la primera especie, todo esto con el fin de conseguir un espectro de acción mas amplio al otorgado por una especie cualquiera que sea esta y de cualquier origen posible en cualquier fase de crecimiento vegetativo, pudiendo o no contener agentes que le otorguen las propiedades adicionales de bactericida bacteriostático

La presente invención además se refiere a una formulación funguicida bactericida bacteriostática de amplio espectro con acción sobre hongos y/o bacterias que son responsables de enfermedades fungosas y/o bacteriosis sobre humanos y/o animales, como también sobre bacteriosis y/o hongos que pueden infectar alimentos, evitando así su crecimiento y/o en fase curativa sobre bacterias y/o ya instalados, usado en fase preventiva y/o curativa, la cual consiste en una presentación comercial para repostería que permite introducir una o más cepas de Trichoderma vivas y/o extracto de estas teniendo como principio activo lactonas en una concentración suficientes que permitan inhibir el crecimiento de hongos (como por ejemplo penicilinium y otros) sobre el pan en particular y masa en general, una vez cocinado, alargando así su vida útil.

Además se refiere a una presentación comercial para su uso en medicina humana, que puede contener como principio activo una o mas especies vivas de Trichodermas , extractos de estas (lactonas), combinación de ambas y/o lactonas de cualquier origen (sintética o extractos orgánicos puro y/o impuros) en



un medio, liquido, polvo, fosfolipidico (incluyendo liposomas),crema, supositorios, comprimidos, cápsulas, colutorios, soluciones oftálmicas y otros aceptados en fármaco técnica y a concentración suficiente que permitan realizar una acción preventiva y o curativa sobre los hongos responsables de enfermedades en humanos, mamíferos en general, aves y peces.

EJEMPLO 1

Procedimiento de preparación de la composición que comprende dos o más especies vivas de Trichoderma.

Se identifican y seleccionan las cepas de *Trichoderma viride*, *Trichoderma Longibratum* y *Trichoderma Harziano*, posteriormente se procede a cultivarlas en un bioreactor tradicional alimentado con glucosa – maltosa para obtener una solución acuosa rica en secreciones pero pobre en biomasa de Trichodermas y luego se realizo un tamizado que permitió recoger las esporas presentes en este cultivo.

Las esporas de estos hongos fueron cultivadas sobre una capa de avena previamente esterilizada por medio de una exposición controlada de microondas y levemente hidratada hasta llegar a aislar en frascos separados cada especie.

Para evitar la aniquilación de las especies al estar cohabitando juntas en el cultivo, se realizo una transformación mediante la exposición a radiación de la cepa de *Trichoderma Longibratum*, transformándola por selección inducida en una cepa resistente a las secreciones fungicidas que liberan las dos especies de Trichodermas que contiene el producto final. Más específicamente, las especies madres de *Trichoderma Longibratum* fueron sometidas a micro



exposiciones de cobalto durante 50 generaciones, obteniéndose una cepa de características únicas.

Posteriormente al sustrato se incorpora extracto de Rubus sp, en una concentración no inferior a 0,68 mg/ml.

EJEMPLO 2

Composición que comprende dos o más especies vivas de Trichoderma.

Composición que comprende Trichoderma Harziano, Trichoderma Viride y Trichoderma Longibratum en las proporciones: 10:20:70 o 99:05:05.

EJEMPLO 3

Procedimiento de preparación de la composición a base de látex y de dos o más especies vivas de Trichoderma.

Se mezclan 60 litros de una base de látex, que puede o estar adicionado el color, con 100 gramos de la composición del ejemplo 1 y se revuelve por cualquier método (incluido el manual) hasta obtener una solución homogénea. Definido el color que se dará al látex se agregan 10 gramos de colorante vegetal y/o orgánico y/o inorgánico previamente disuelto en 1 litro de agua caliente. Dependiendo de la tonalidad que se requiera, la cantidad de colorante puede subir o bajar.

EJEMPLO 4

Composición a base de látex que comprende dos o más especies vivas de Trichoderma.



Composición a base de látex que puede o no estar adicionado el color, que comprende por cada 60 litros de base látex 100 gramos de la composición del ejemplo 1.



REIVINDICACIONES

1.- Composición bactericida, bacteriostática y fungicida CARACTERIZADA porque comprende dos o más especies vivas de Trichodermas.

2.- Composición de acuerdo con la reivindicación 1 CARACTERIZADA porque comprende dos o más especies de Trichodermas naturales o modificadas genéticamente, cepas madre de especies y/o sub especies de Trichodermas de cualquier origen natural o de laboratorio, vivas y activas en cualquiera de sus fases de crecimiento vegetativo, esporas micelio, fraccionado o en distintas proporciones.

3.- Composición de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 2 CARACTERIZADA porque comprende dos o más especies de Trichodermas seleccionadas entre Trichoderma harzianum, viride, polysporum, longibratum, koningii y variaciones de estas obtenidas en laboratorio identificadas como T22, Tr 115, Tr 116, KRL-AG2 (Rifai), incluyendo holoformas como Hypocrea y Podostroma.

4.- Composición de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 3 CARACTERIZADA porque comprende tres especies vivas de Trichodermas.



5.- Composición de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 4
CARACTERIZADA porque comprende tres especies vivas de Trichodermas
seleccionadas de las cepas Trichoderma viride, Trichoderma Longibratum y
Trichoderma Harziano.

6.- Composición de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 5
CARACTERIZADA porque las tres especies vivas de Trichodermas se
encuentran en las proporciones: 10:20:70 o 99:05:05.

7.- Composición de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 6
CARACTERIZADA porque comprende las tres especies vivas de Trichodermas y
un extracto vegetal de naturaleza bactericida bacteriostático.

8.- Composición de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 7
CARACTERIZADA porque el extracto es un extracto hidroalcoholico de Rubus
sp.

9.- Composición a base de látex para pintura cicatrizante de poda
CARACTERIZADA porque comprende una base de látex, que puede o tener
adicional el color, y una composición de acuerdo cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 8.



10.- Composición de acuerdo con la reivindicación 9 CARACTERIZADA porque comprende aproximadamente 60 litros de dicho látex y 100 gramos de dicha composición.

11.- Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10 CARACTERIZADO porque sirve para proteger plantas, suelos, semillas, árboles y/o frutos contra el daño de una peste de insectos, bacterias, hongos, virus y/o una combinación de dos o más de estos agentes.

12.- Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11 CARACTERIZADO porque se aplica en forma de polvo seco o en forma de solución acuosa.

13.- Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12 CARACTERIZADO porque la aplicación se realiza mediante técnica de voleo, en impregnación de semillas, directamente a las plantas, incorporado a tanques de ferti-riego, por medio de maquinas espalderas, maquinas pulverizadoras y maquinaria electrostática.

14.- Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13 CARACTERIZADO porque la dosis aplicada es de 1 kilo hectárea o 2 kilo hectárea, por cada 600 litros de agua.

15.- Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10 CARACTERIZADO porque sirve como fungicida bactericida bacteriostático de



amplio espectro con acción sobre hongos y/o bacterias que son responsables de enfermedades fungosas y/o bacteriosis sobre seres humanos y/o animales y/o alimentos.

16.- Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 15 CARACTERIZADO porque puede ser utilizada en la fase preventiva y/o en la fase curativa.

17.- Procedimiento de preparación de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 CARACTERIZADO porque comprende una siembra inicial sobre bandejas que contienen el micro nutriente hidratado en un extracto vegetal, con dos o más especies de Trichodermas a la forma de propágulos madres y la cosecha de la biomasa generada por medios mecánicos.

18.- Procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 17 CARACTERIZADO porque la siembra comprende tres especies de Trichodermas a la forma de propágulos madres.

19.- Procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 18 CARACTERIZADO porque las tres especies de Trichodermas son seleccionadas de las cepas *Trichoderma viride*, *Trichoderma Longibratum* irradiado y *Trichoderma Harziano*.



20.- Procedimiento de preparación de acuerdo con las reivindicación 19
CARACTERIZADO porque la proporción de las tres especies es de 50% de
Trichoderma Harziano, 30% de Trichoderma Viridae y 20% de Trichoderma
Longibratum.

